

Práce s buňkami imunitního systému

Řada laboratorních technik moderní imunologie je založena na hodnocení:

- a) počtu
- b) aktivity jednotlivých typů buněk imunitního systému
- c) na průkazu jejich produktů (cytokinů, reaktivních radikálů kyslíku a dusíku, enzymů apod.)

Tyto testy slouží v experimentální a klinické imunologii k vyhodnocení parametrů nespecifické, ale i specifické buňkami zprostředkované imunity.

Jedná se o pracné, materiálně i přístrojově náročné techniky.

v práci s buňkami IS je nutno dodržovat celou řadu zásad:

- Do laboratoře je třeba je dodat rychle (optimálně do 2 hod) vzorek nesražené krve, při odběru je třeba používat protisrážlivé prostředky, vzorky odebírat asepticky, zpomalit stárnutí a aktivitu b. při 4°C
- Buňky ve funkčních testech musí zůstat neporušené, plně vitální – je třeba pracovat rychle, šetrně.
- Pro zachování plné funkčnosti je třeba uchovávat b. ve vhodném prostředí (pH 7,2), je třeba dodat základní minerální látky a při dlouhodobých kultivacích i živiny.
- -pro krátkodobé kultivace pufrovaný fyziologický roztok v různých modifikacích
- -pro dlouhodobou kultivaci média s různými vlastnostmi (např. MEM s 5 – 10% séra)
- Je třeba pracovat asepticky, kontaminující bakterie ovlivňují výsledek testu a při vícedenní kultivaci vzorek zcela znehodnotí
- Pro některé testy se používají buňky v plné krvi, pro jiné se izolují různými postupy
- Pro dosažení standardního výsledku ve funkčních testech je potřeba do testu nasazovat živé buňky v určité koncentraci – buňky se spočítají a sleduje se jejich životnost (■5%)

Izolace buněčných populací

- Buněčné funkční testy se provádějí buď v plné krvi, nebo po izolaci jednotlivých populací. Existuje celá řada separačních metod, které se uplatňují v různé míře pro jednotlivé testy.
- Populaci všech leukocytů lze získat např. pomocí hypotonického šoku, tj. krátkodobému vystavení buněk hypotonickému prostředí, kterému leukocyty s vyšší osmotickou rezistencí odolávají, zatímco erytrocyty podlehnou hemolýze. Zbytek ery po prvním kroku hemolýzy lze lyzovat 0,83% roztokem chloridu amonného.
- lymfocyty a monocyty se získávají nejčastěji centrifugací na denzitním gradientu (médium specifické hmotnosti 1,077g/ml), kdy lymfocyty a monocyty s nižší specifickou hmotností vytváří prstenec nad denzitním médiem, zatímco granulocyty se dostávají do sedimentu. Mono se od lymfo mohou následně oddělit na základě jejich adherence ke sklu nebo plastickým hmotám.

Vlastní testy izolace buněk z periferní krve

- 1. V prvním postupu izolujeme směs mononukleárních b. (mono a lymfo) na denzitním gradientu. Test využívá rozdílné specifické hmotnosti, kdy lehčí lymfocyty a mono zůstávají nad gradientem, zatímco červené krvinky a granulocyty propadávají.
- **Obr. Schéma izolace mononukleárních buněk na denzitním gradientu**
- **I. Pracovní postup:**
- Do zkumavky napipetujeme 3ml roztoku verografinu
- 1ml krve naředíme s 2ml média
- Zkumavku nakloníme a verografin opatrně převrstvíme ředěnou krví
- Odstředíme 30 – 40min při 400G
- Opatrně odsajeme prstenec mononukleárních buněk
- přidáme 4ml média, resuspendujeme
- Odstředíme 5min
- Opatrně slejeme (odsajeme) supernatant
- Přidáme kapku séra, sediment resuspendujeme
- Zhotovíme nátěr
- **U izolovaných buněk sledujeme:** Čistotu suspenze na zhotoveném, obarveném nátěru
- životnost zbarvením trypanovou modří, koncentraci buněk v suspenzi

Vlastní testy izolace buněk z periferní krve

- 2. Suspenzi všech leukocytů můžeme získat např. pomocí hemolýzy červených krvinek. Ty mají nižší osmotickou rezistenci než leukocyty, takže při krátkodobém vystavení buněk hypotonickému prostředí červené krvinky lyzují, zatímco bílé zůstávají neporušené. Podmínkou je rychle vyrovnat původní izotonicitu prostředí.
- **Obr. Schéma izolace leukocytů pomocí hemolýzy červených krvinek**
- **II. Pracovní postup:**
- Do označené zkumavky napipetujeme 1ml krve
- Přidáme 2ml redestilované vody, smícháme
- mícháme 40s, přidáme 1ml 2,7%roztoku NaCl
- Odstředíme 5min
- Opatrně slejeme (odsajeme) supernatant
- Přidáme 4ml pufru, sediment resuspendujeme
- Odstředíme 5min
- Opatrně slejeme (odsajeme) supernatant
- Přidáme kapku séra, sediment resuspendujeme
- Zhotovíme nátěr

Vlastní testy izolace buněk z periferní krve

- Nejpřesnější metody separace využívají specifickou vazbu monoklonálních protilátek na povrchové molekuly buněk. To se uskuteční např. pomocí magnetické separace (v tom případě se použijí protilátky s navázanými magnetickými částicemi) nebo třídícím buněk v průtokovém cytometru.

Stanovení koncentrace a životnosti buněk

- 1. Buňky izolované z výše uvedených postupů je třeba do testů nasazovat ve vhodné koncentraci. Buňky se počítají
 - a) v Bürkerově komůrce nebo
 - b) pomocí počítačových automatů
- př.do kultivačních testů (např. testu blastické transformace lymfocytů) se buňky nasazují v koncentraci 1 – 2 mil./ml, ve fagocytárních testech se používají suspenze neutrofilů v koncentraci 5 – 10mil./ ml.
- 2. Další podmínkou je plná životnost a funkční aktivita testovaných buněk.
- Životnost se sleduje a) ve světelném nebo
- b) fluorescenčním mikroskopu (trypanová modř, propidium jodid), které jsou schopny proniknout přes porušenou cytoplazmatickou membránu do mrtvých buněk, ale nepronikají do buněk živých.

Životnost buněčné suspenze na počátku testu by měla být alespoň 95%.

Podmínky uchování buněk

- K uchování vitality a funkční aktivity se buněčné suspenze uchovávají v pufrovaném fyziologickém roztoku (pH 7,2), často s ionty vápníku, hořčíku (nutné pro některé reakce) a obohacené glukózou (např. Hanksův solný roztok). Pro vícedenní kultivace se používají tekutá média s živinami a přídavkem bovinního fetálního séra, podobně jako při kultivaci tkáňových kultur.
- Takto připravené suspenze buněk se používají v testech průkazu nespecifické aktivity nebo specifické buněčné imunity. Funkčním testům předchází testy stanovení počtu, případně morfologie daných buněk, které mají základ v hematologických a histologických technikách. Stanovení počtu buněk je také v řadě testů předpokladem k přepočtu zjištěné hodnoty funkční aktivity na konkrétní počet buněk.

Testy počtu a aktivity buněk imunitního systému

I. Metody stanovení počtu, morfologie buněk

- Celkové počty – Bürkerova komůrka, počítací automaty
- Diferenciální počet – krevní nátěr hodnocený mikroskopicky, automaty
- Morfologická charakteristika buněk krve, kostní dřeně - hematologie
- Morfologická charakteristika buněk v lymfatických orgánech - histologie
- Rozlišení buněk podle rozdílných vlastností (živé x mrtvé, nekrotické x apoptické) – světelná a fluorescenční mikroskopie, průtokové cytometrie
- Subpopulace podle povrchových genotypických znaků buněk v suspenzích – průtoková cytometrie
- Rozlišení povrchových nebo intracelulárních znaků buněk ve tkáních – imunohistochemie

Testy počtu a aktivity buněk imunitního systému

II. metody stanovení aktivity buněk – funkční testy

- Průkaz povrchových nebo intracelulárních znaků aktivity – průtoková cytometrie
- Testy fagocytární aktivity (adherence, ingesce, produkce radikálů, baktericidie)
- Testy aktivity lymfocytů – bioeseje, ELISA, RT – PCR
- Testy specifické buněčné imunity – testy po stimulaci specifickým antigenem
- Testy in vivo, např. kožní test časné nebo oddálené přecitlivělosti

Vyšetření lymfocytárních subpopulací a jejich funkce

- Stanovení **počtu a funkce lymfocytů**, včetně jejich subpopulací, je nezbytnou součástí celkového imunologického vyšetření pacienta a přispívá ke stanovení správné diagnózy.
- Lymfocyty u zdravého jedince reprezentují v cirkulující krvi asi jednu třetinu buněk bílé řady. První důležitou informací o počtu a zastoupení lymfocytů získáme **jednoduchým vyšetřením krevního obrazu**. **Diferenciální krevní obraz** však není schopen charakterizovat jednotlivé lymfocytární subpopulace, neboť na základě buněčné morfologie není možno rozlišit **T** – a **B**-lymfocyty. Znalost počtu leukocytů a zastoupení lymfocytů je však nezbytným předpokladem správné interpretace imunologického vyšetření.

Průkaz povrchových nebo intracelulárních znaků aktivity

- Studium lymfocytárních subpopulací se stalo realizovatelné poté, co bylo zjištěno, že buňky exprimují na svém povrchu rozličné specifické molekuly (znaky). Tyto můžeme uspořádat do skupin, jež charakterizují **a)** buněčnou linii, **b)** stav diferenciaci jednotlivé buňky, **c)** její aktivace. Výrazný pokrok přinesla dostupnost monoklonálních protilátek, které jsou schopny rozpoznat molekuly na povrchu buňky jako antigeny. Povrchový znak definované struktury rozpoznatelný skupinou monoklonálních protilátek je zařazen do skupiny diferenciacních **CD znaků**. V současné době je již na lidských leukocytech charakterizováno a označeno více než 200 povrchových znaků.

Průkaz povrchových nebo intracelulárních znaků aktivity

- Jednotlivé znaky a jejich kombinace prokazujeme metodou **přímé fluorescence**. Buňky jsou inkubovány s protilátkou označenou fluorescenčním barvivem, fluorescenční mikroskop umožní analyzovat výsledek vazby Ag a Ab a znázornit tak buněčné populace, což je ale nesmírně časově náročné.
- **Průtoková cytometrie** je metoda, která dokáže v krátkém časovém intervalu analyzovat tisíce buněk označených monoklonálními protilátkami. Individuální buňky jsou navíc charakterizovány i na základě své **velikosti** a **granularity**. Běžně můžeme zjišťovat **koexpresi** různých antigenů (běžně dvou až tří) **na povrchu buněk** pozitivních či negativních pro daný znak, tak i **intenzitu fluorescence**. **Zavedení průtokové cytometrie do praxe umožňuje kvalitní znázornění a vyšetření lymfocytárních subpopulací.**

Základní povrchové znaky

- Základní znaky používané pro T- lymfocyty jsou CD3, jež je součástí komplexu **TCR – CD3** komplexu, **CD4 a CD8**, které charakterizují pomocné a cytotoxické T – lymfocytární subpopulace
- Základní znaky používané pro B- lymfocyty jsou **CD19** nebo **CD20**
- Základní znak používaný pro NK buňky je **CD56** bez koexprese s CD3. Aktivačním znakem je **CD25** (receptor pro IL-2). Na všech leukocytech nalézáme **CD45**, na monocytech **CD14**.

Testy aktivity lymfocytů

- **Proliferace** je jedním z fyziologických jevů buněčné aktivace. Použitím radioaktivně značeného **thymidinu** (^3H -thymidin) jsme schopni v laboratoři proliferaci lymfocytů kvantitativně vyšetřit, neboť thymidin se zabuduje do DNA dělících se buněk a takto je označí.
- **Tvorba nové DNA je úměrná množství buněčných dělení.**
- K dělení můžeme lymfocyty stimulovat in vitro polyklonálně a nebo specificky. **Lektiny**, rostlinné proteiny vážící se na membránové glykoproteiny buňky, působí jako **polyklonální mitogeny**. Aktivují lymfocyt nezávisle na jeho antigenní specifitě.
- Pro stimulaci T-buněk se používají **Phytohemagglutinin** (PHA) a **konkavalin A** (Con A),
- K aktivaci B-buněk **pokeweed mitogen** (PWM). Monoklonálních protilátek lze také použít, příkladem může být **anti-CD3** protilátka.
- Ke specifické stimulaci: **Tetanického toxoid** (antigen) **E.coli, tuberkulinu**. Je zde nezbytná přítomnost monocytů jako APC.

Testy aktivity lymfocytů

- Při vyšetření se inkubují izolované buňky nebo plná krev pacienta s příslušným stimulantem. Po několikadenní kultivaci se přidá do suspenze **triciem značený thymidin** a po několika hodinách se oddělí buněčná suspenze (s navázaným označeným thymidinem) od kultivačního media (v němž se nachází thymidin, který nebyl do DNA inkorporován). Energie radiace se převede na světelný signál, testované buněčné vzorky se vyhodnotí ve **scintilačním počítači**. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet světelných impulzů za minutu. Celá metodika je náročná na sterilitu i přesnost provedení a je používána zejména při vyšetření nemocných s podezřením na závažnou **primární nebo sekundární imunodeficienci**.

Cytotoxické metody

- Zničení cílových buněk může být dosaženo v imunitních reakcích různými buňkami: **Tc lymfocyty**, **NK buňkami** nebo **makrofágy**, **neutrofily** či dalšími **cytotoxickými buňkami v cytotoxické reakci závislé na protilátkách** (dříve se buňky účastnící se této reakce označovaly K buňky).
- V testu **cytotoxických lymfocytů** (závislý na MHC, nezávislý na protilátkách) se používají lymfocyty z imunního zvířete, které se kultivují v různém poměru k cílovým buňkám (zpravidla nádorovým), jež byly označeny radioaktivním chromem (^{51}Cr). Po inkubaci a odstředění se supernatant testuje na radioaktivitu.
- Nedostatečná cytotoxická reaktivita se nachází u pacientů s nedostatečnou funkcí thymu, kombinovanou imunodeficiencí, některými nádorovými chorobami, při imunosupresivní terapii a někdy i při mykobakteriálních chorobách, některých virových chorobách a vážných autoimunitních chorobách.

Cytotoxické metody

- **NK buňky** jsou spontánně cytotoxické pro různé buňky, mají Fc receptor, ale nemají povrchové imunoglobuliny. Jejich aktivita může být testována výše uvedeným testem uvolňování ^{51}Cr .
- Cytotoxicita závislá na protilátkách (**ADCC** – antibody dependent cellular cytotoxicity):
cílové buňky se zpracují sérem s protilátkami (ale bez komplementu), označí radioaktivním chromem (^{51}Cr) a pak exponují efektorovými buňkami. Tento typ buněčné toxicity byl pozorován u matek po opakovaných porodech dětí téhož otce, při transplantační reakci, autoimunitě i nádorových onemocnění